

Ciclo reproductivo de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en la ría del Eo (noroeste de España)

A. Remacha-Triviño

University of Rhode Island, Dpt. of Fisheries, Animal and Vet. Sciences, 20A Woodward Hall, Kingston, RI-02881, EE UU. Correo electrónico: tonirem@gmail.com

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

Se estudia el ciclo reproductivo de *Solen marginatus* (Pulteney, 1799) en la ría del Eo (noroeste de España) mediante histología rutinaria. Se añade un nuevo procedimiento de seguimiento rápido del ciclo gametogénico de la especie basado en la observación de la gónada a escala macroscópica y se revisa el método de estimación del tamaño de los ovocitos mediante ocular micrométrico. La fase 0 (reposo sexual) ocurre en julio-agosto. La fase I (multiplicación de las gonias) sucede en agosto-octubre. La fase II (gametogénesis) se desarrolla en noviembre-abril. La fase III (reproducción) tiene lugar en mayo-junio. La evolución de la gametogénesis es independiente del tamaño de los individuos.

Palabras clave: Bivalvos, Solenidae, navajas, reproducción, gametogénesis, gametos.

ABSTRACT

Reproductive cycle of the razor clam Solen marginatus (Pulteney, 1799) in Eo ria (northwestern Spain)

The reproductive cycle of the razor clam Solen marginatus (Pulteney, 1799) was investigated by routine histology. A new approach oriented towards fast monitoring of the gametogenic cycle based on macroscopic observation of gonads is presented. The method, aimed at estimating oocytes size with the aid of a micrometer eyepiece, is reviewed. Phase 0 (sexual rest) occurs in July-August. Phase I (proliferation of gonias) occurs in August-October. Phase II (gametogenesis) develops in November-April. Phase III (reproduction) takes place in May-June. The evolution of the gametogenesis is independent of the size of the specimens.

Keywords: Bivalves, Solenidae, razor clams, reproduction, gametogenesis, gametes.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento detallado del ciclo reproductivo en especies de interés comercial es de gran importancia, bien para el establecimiento de una política de explotación más racional como recurso y regulación de sus poblaciones natura-

les o bien con vistas a un posible futuro cultivo (Remacha-Triviño, 1996).

Las navajas son moluscos comerciales de demanda creciente, y este hecho puede implicar la sobreexplotación de sus poblaciones naturales. La península Ibérica alberga en su litoral a todas las especies de navajas europeas (Cosel,

com. pers.), lo cual es reflejo de sus óptimas condiciones para iniciar la explotación sostenible de estos moluscos, a los que la acuicultura, en su evolución, debería dirigirse.

Solen marginatus (Pulteney, 1799) constituye uno de los bivalvos intermareales representativos de las costas españolas. Concretamente, según Cosel (1993), la especie se distribuye a lo largo del Mediterráneo occidental y, en el Atlántico, desde las islas británicas hasta Mauritania.

Se conocen solamente seis referencias sobre el ciclo reproductivo de *S. marginatus* (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1996; Remacha-Triviño, 1996; Tirado *et al.*, 2002; Remacha-Triviño, 2002; Martínez, 2002; López, Rodríguez y Carrasco, 2005).

Este trabajo comprende los siguientes objetivos: (a) presentar un estudio detallado sobre el ciclo reproductivo de *S. marginatus*; (b) mostrar un nuevo procedimiento de seguimiento rápido del ciclo gametogénico de la especie basado en observaciones macroscópicas de la gónada; (c) revisar el método de estimación del tamaño de los ovocitos mediante ocular micrométrico; y (d) comprobar si el muestreo mediante arpón de mariscador es válido para la realización de estudios de ciclo reproductivo. De este modo se incrementa el conocimiento de la biología reproductora de *S. marginatus*, información que puede utilizarse con el fin de iniciar, en el futuro, un cultivo extensivo de esta especie orientado a satisfacer su demanda y garantizar la conservación de sus bancos naturales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Situación geográfica y periodo de muestreo

Las parcelas de muestreo se establecieron en el interior de los bancos de Reme, La Regueira y Peñalba de la ría del Eo (noroeste de España) (una parcela por banco), en aquellas zonas de presencia de la especie, descubiertas en bajamares de coeficiente 90 (figura 1). Los muestreos se efectuaron con periodicidad mensual de junio de 1994 a mayo de 1995, recogiendo sesenta y cinco individuos por muestra mediante fisga o

arpón de mariscador. Esta herramienta provoca mutilaciones o desgarros que afectan a la gónada en un porcentaje estimado del 3 % de las muestras. Los ejemplares mutilados o alterados se desecharon. Tras su transporte al laboratorio, los individuos se marcaron, se midió la longitud de las valvas a la centésima de centímetro con un calibre y el peso escurrido a la centésima de gramo más próxima con una balanza de precisión. Los animales se fijaron en formol al 4 % en agua de mar para su estudio posterior.

Análisis histológicos

Se disecó la parte del pie que contiene la gónada (Remacha-Triviño, 1996) de seis machos y seis hembras de cada mes. Dichos tejidos se deshidrataron e incluyeron en parafina según Durfort (1993). De cada bloque, se obtuvieron de 20 a 30 secciones de 7 µm que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Las fases de desarrollo de la gametogénesis de *S. marginatus* se describieron de acuerdo a la escala histológica de Chipperfield (1953) y Lubet (1959) para las especies *Mytilus edulis* L., 1758 y *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Remacha-Triviño, 1996; Martínez *et al.*, 1997), también denominada escala de Lubet (1959) por otros autores (Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1992; Villalba, 1995; Rodríguez-Moscoso *et al.*, 1996).

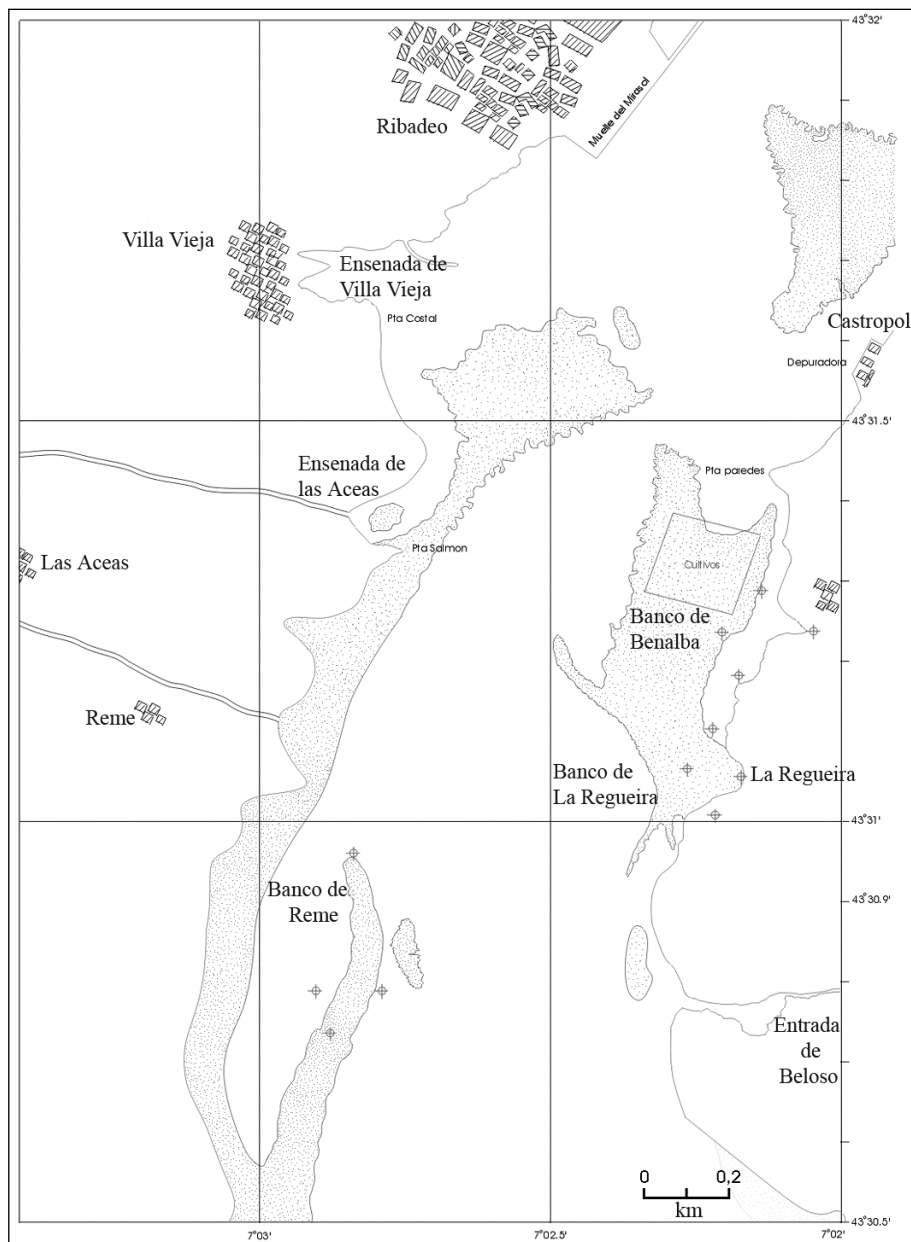
Observación macroscópica

El pie de cada ejemplar se abrió ventralmente en toda su longitud siguiendo la línea de intersección de éste con el plano sagital. Las gónadas se clasificaron en diferentes estadios de acuerdo a su apariencia macroscópica.

Estimaciones de tamaño de los ovocitos

Se disecó la región distal del pie de los individuos. La presencia de ovocitos se detectó al microscopio en una muestra de gónada previamente disgregada sobre un portaobjetos. En los casos en que se confirmó la presencia de ovocitos, se añadió a la muestra la cantidad de agua de mar necesaria para inducir la reorientación espontánea de los ovoci-

Figura 1. Mapa parcial de la parte alta de la ría del Eo y localización de las tres áreas de muestreo objetivo del estudio (i. e. partes de los bancos de Peñalba, La Regueira y Reme comprendidas entre los símbolos "⊕").



tos, supuestos elipsoides triaxiales, hacia su posición más estable (figura 2). Así, la longitud del eje *A* (distancia máxima o longitud de la célula) se puede medir con la ayuda de un ocular micrométrico. Por este procedimiento, en aquellas fases de la gametogénesis en las que se observaron ovocitos, se midieron las longitudes de entre 50 y 100 ovocitos por hembra. Posteriormente, se representaron los diagramas de dispersión, medias, intervalos de confianza y gráficas de crecimiento de las longitudes estimadas de los ovocitos. Se descartaron las células cuyas longitudes estimadas eran inferiores a 13,5 m.

Pruebas de independencia

El arpón de mariscador o fisga constituye un método de captura sesgado con respecto al tamaño de los individuos. Para evaluar la independencia entre el tamaño de los animales capturados mediante dicho procedimiento y el grado de desarrollo del ciclo reproductivo, se realizó un test de independencia relativo a la correlación (Martín y Luna, 1993) entre las variables longitud de las valvas y longitud media estimada de los ovocitos de los individuos.

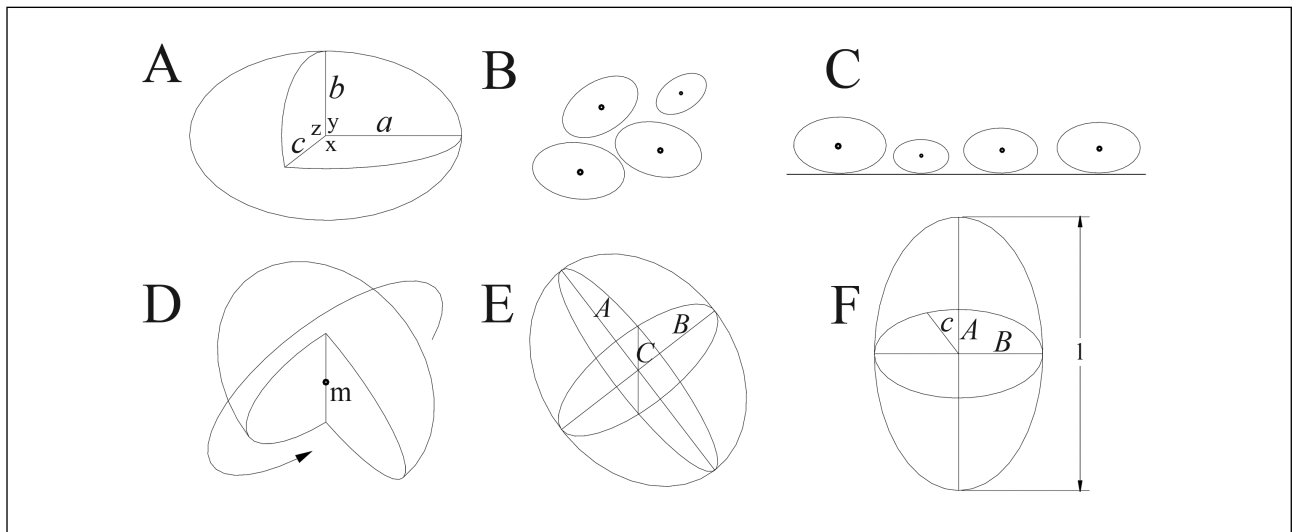


Figura 2. (A): elipsoide triaxial de semiejes a , b y c . (B): muestra de ovocitos sobre portaobjetos. (C): ovocitos tras añadir agua de mar al portaobjetos. (D): reorientación del ovocito tras ser inmerso; la célula tiende a disponerse en su posición más estable en la que su eje menor C se orienta perpendicularmente al plano del portaobjetos. (E): ovocito reorientado mostrando la disposición de ejes A , B y C . (F): ovocito reorientado observado a través del ocular microscópico; los ejes A y B tienden a disponerse paralelos al plano del portaobjetos; el eje mayor A es la distancia máxima o longitud (l) de la célula. (A): eje mayor; (a): semieje mayor; (B): eje mediano; (b): semieje mediano; (C): eje menor; (c): semieje menor; (m): centro de masas; (x, y, z): ejes de coordenadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis histológico

La extensión de la gónada de *S. marginatus* se reduce a la cavidad interna del pie y capas musculares pedias adyacentes en todas las fases del ciclo reproductivo. Esto contradice a Rodríguez-Moscó *et al.* (1996), que afirman que la gónada de *S. marginatus* se introduce a través del pie durante el periodo de maduración.

En su momento de máxima madurez, la gónada se prolonga desde el ápice del pie hasta el hepatopáncreas. Los folículos gonadales se abren hacia la luz de la cavidad pedia en ausencia de tejidos periféricos.

La fase 0 (reposo sexual) tiene lugar en julio y agosto. El sexo es indistinguible y el tejido foliular está limitado a espacios muy reducidos situados entre los fascículos musculares de la cavidad pedia (figuras 3A, 5A y 5B), no habiéndose observado gónada en algunos individuos. Son habituales los grupos de hemocitos en torno a las masas necróticas no absorbidas en la subfase III D previa. Los elementos gametogénicos integrando los folículos se reducen a un reservorio de células madres (figura 3B,C), con las

siguientes características: (a) formas elipsoidales, esferoidales o poliédricas; (b) coloraciones basófilas o ligeramente acidófilas; (c) mayor tamaño que oogonias y espermatogonias (figura 3E,G,L); (d) cociente nucleocitoplásmico alto; y (e) límite entre núcleo y citoplasma difuso.

La fase I (multiplicación de las gonias) sucede en agosto-octubre. Las oogonias y espermatogonias son células morfológicamente similares, vagamente elipsoidales, de citoplasma neutrófilo y núcleo ligeramente acidófilo que se disponen generalmente en grupos de proliferación mitótica los cuales se reducen paulatinamente hasta constituirse como células aisladas (figura 3D,G,L). En los machos, los primeros espermatozoides se observan en agosto (figura 3L).

La fase II (desarrollo de la gametogénesis) se desarrolla en noviembre-abril. La gónada coloniza gradualmente los espacios intermusculares de la cara interna de la cavidad pedia (a excepción de ciertas áreas dorsales de musculatura integumentaria) y porciones de vísceras expuestas a la misma (por ej.: intestino, estilo cristalino y glándula digestiva). Se observan los primeros ovocitos previtelogénicos (figura 3E,J), cuyas características son: (a) núcleo y citoplasma de similares grados de basofilia y límites difusos; (b)

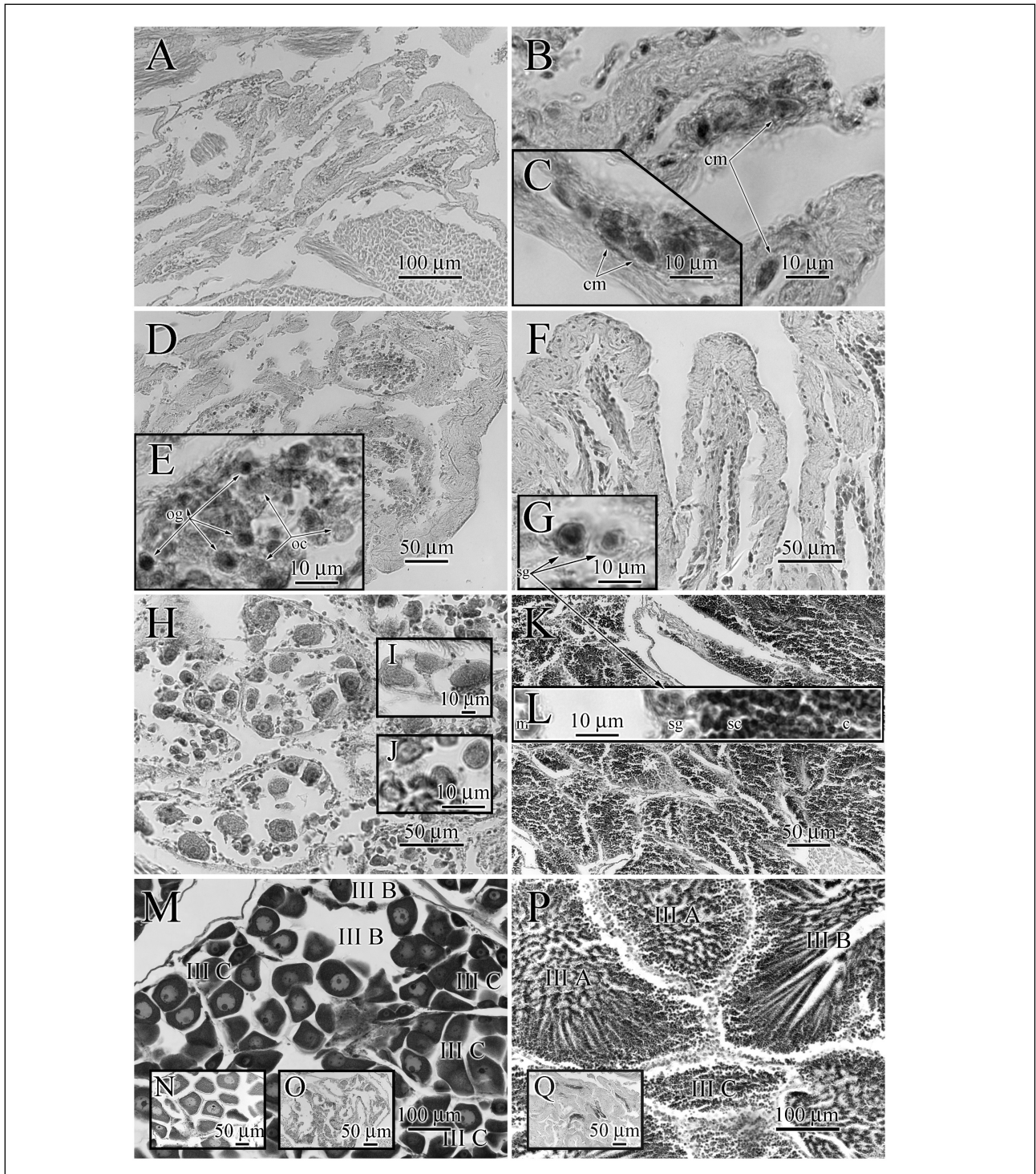


Figura 3. Secciones histológicas del ciclo reproductivo. (A): fase 0; sexo indeterminado. (B-C): fase 0; grupos de células madres; sexo indeterminado. (D): gónada femenina en fase I. (E): detalle de la imagen previa mostrando oogonias y los primeros ovocitos. (F): gónada masculina en fase I. (G): detalle de imagen previa mostrando espermatogonias; nótese la similitud con las espermatogonias mostradas en L. (H): gónada femenina en fase II. (I): detalle de H mostrando las asociaciones de los ovocitos a las células foliculares. (J): detalle de H mostrando los primeros ovocitos. (K-L): gónada masculina en fase II. (M): gónada femenina simultáneamente en fases III B y III C. (N): gónada femenina en fase III A. (O): gónada femenina en fase III D. (P): gónada masculina simultáneamente en fases III A, III B y III C. (Q): gónada masculina en fase III D. (c): espermátidas y cabezas de espermatozoides; (cm): células madres; (m): músculo; (oc): ovocitos; (og): oogonias; (sc): espermatoцитos; (sg): espermatogonias.

cociente nucleocitoplásmico menor que el de las gonias; y (c) se encuentran unidos a la pared del folículo o en su interior en conexión con células foliculares aéreas (figura 3H,I). En los meses invernales, la vitelogénesis evoluciona lentamente y los ovocitos incrementan progresivamente su tamaño. La fase tardía de la vitelogénesis se desarrolla en marzo-abril. El núcleo de los ovocitos tiende a emigrar hacia una posición apical de la célula. En machos, el número de espermatozoides aumenta en noviembre, y en diciembre y enero se observa una cantidad inferior de espermatozoides y una disminución de volumen de los folículos. En febrero se reanuda el desarrollo de los folículos y la proliferación de espermatozoides, que son producidos en grandes cantidades. Las primeras masas de espermatozoides aparecen en marzo, en una proporción relativamente baja, que pasa a ser mayoritaria en abril. En estos dos meses tienen lugar las primeras emisiones minoritarias de gametos.

La fase III (reproducción) tiene lugar en mayo y junio y comprende cuatro subfases: III A (madurez), III B (semivaciación), III C (restauración) y III D (emisiones tardías). En ella se observan gónadas repletas (figura 3M,N,P) de folículos muy dilatados y cargados de gametos a punto de ser emitidos. El pie está, generalmente, tan engrosado que se retrae con dificultad. Los ovocitos se desprenden de la pared del folículo simultáneamente a la adquisición de una apariencia más esférica, con el fin de facilitar su emisión. Los folículos masculinos presentan un predominio de espermatozoides, que tienden a disponerse en el lumen.

La subfase III D (emisiones tardías) sucede en junio. Los folículos están semivaciados al haber emitido parte de los gametos. Tras completar la emisión, los elementos gametogénicos se reducen a un pequeño reservorio de células madres y a una serie de masas necróticas correspondientes a los elementos celulares no desovados.

El desarrollo del ciclo reproductivo de *S. marginatus* se ajusta al patrón general observado por otros autores en otras especies de bivalvos de áreas templadas (Lubet, 1959; Casavola *et al.*, 1985; Galinou-Mitsoudi y Sinis, 1994; Hooker y Greese, 1995).

Según Remacha-Triviño (1996), el ciclo gametogénico de esta especie en dicho periodo resultó ser bastante similar al de *M. edulis* (Lubet, 1959) y *Ensis minor* (Chenu, 1843) (Casavola *et*

al., 1985) difiriendo, sin embargo, del correspondiente al de las especies *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) (Rodríguez-MoscOSO *et al.*, 1992) y *Ruditapes decussatus* (L., 1758) (Rodríguez y Carrasco, 1995) las cuales, según dichos autores, inician la gametogénesis en el mes de enero (tabla I). Por su parte, Shafee y Daoudi (1991) observaron en la costa atlántica de Marruecos, y durante los años 1986 y 1987, que la gametogénesis de *R. decussatus* se iniciaba a mediados del invierno.

Tabla I. Resultados de las pruebas de independencia de las características longitud de las valvas y longitud media estimada de los ovocitos y los coeficientes de determinación de las regresiones \bar{L} (ovocitos) | L(valvas).

Mes	Valor-P	r ²
Octubre	0,3335	0,093
Noviembre	0,3842	0,077
Diciembre	0,1710	0,130
Enero	0,3470	0,047
Febrero	0,4298	0,033
Marzo	0,8588	0,002
Abril	0,6150	0,010
Mayo	0,4192	0,033
Junio	0,1563	0,190

La evolución del ciclo reproductivo de *S. marginatus* observada en este trabajo es coincidente con otras referencias sobre la especie (Rodríguez-MoscOSO *et al.*, 1996; Tirado *et al.*, 2002; Martínez, 2002; López, Rodríguez y Carrasco, 2005) y otros Solenidae (Gaspar, 1996; Darriba, San Juan y Guerra, 2004), salvo las variaciones esperables debidas a diferencias de alimento disponible, temperatura, salinidad y, en general, al resto de condiciones ambientales potencialmente influyentes.

Las características de células madres, espermatogonias y oogonias son análogas a las descritas por otros autores (Tranter, 1958; Lubet, 1959; Darriba, San Juan y Guerra, 2004). Difieren, sin embargo, de las observaciones de Darriba, San Juan y Guerra (2004) realizadas en *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865), ya que en *S. marginatus* las oogonias y espermatogonias son de tamaños y apariencia similares y se distinguieron dos tipos de células madres, basófilas y débilmente acidófilas, lo que podría deberse a diferencias sexuales.

Las subfases III A (madurez), III B (semivaciación) y III C (restauración) se observaron simultáneamente en una minoría de individuos

(figura 3P), y en el resto se ha detectado siempre la coexistencia de dos de ellas (figura 3M). No se encuentran individuos, sin embargo, cuya totalidad de folículos observados pertenezca exclusivamente a una de estas tres subfases, tal y como suele ser propio del resto de etapas del ciclo. Si bien es lógico decantarse hacia una de las tres subfases basándose en el estado de la mayoría de folículos, la frontera entre ellas resulta, en ocasiones, difícil de distinguir, dado que en las hembras: (a) es infrecuente encontrar folículos en estado III A, en ausencia de ovocitos adheridos a la pared del folículo que implican una restauración III C simultánea; (b) los folículos III A suelen presentar espacios que parecen indicar un cierto semivaciamiento III B previo, y así la pérdida de la forma poligonal observada en los ovocitos maduros puede explicarse como una consecuencia de la menor compresión en el folículo (Remacha-Triviño, 1996; Remacha-Triviño, 2002; Martínez, 2002; Darriba, San Juan y Guerra, 2004); y (c) los folículos III C suelen presentar ovocitos maduros libres en el lumen. En los machos: (a) no está claro que la restauración III C implique un predominio de espermatoцитos en el folículo (Darriba, San Juan y Guerra, 2004), siendo probable que la restauración lleve a nueva producción mayoritaria de esperma o que la producción de esperma y espermatoцитos sea entonces equilibrada; y (b) en la fase II se observan folículos con una producción minoritaria de esperma. Si se considera maduro a aquel folículo masculino en el que la fracción de esperma es predominante (Remacha-Triviño, 1996; Remacha-Triviño, 2002; Darriba, San Juan y Guerra, 2004), su madurez podría alcanzarse tras haberse emitido parte del esperma

generado en la fase II, lo cual implicaría los frecuentes casos observados de folículos masculinos de amplios espacios en el lumen y, por tanto, potencialmente clasificables como III B.

De acuerdo con lo expuesto, se considera más prudente la elección de la escala de Chipperfield (1953) y Lubet (1959), más precisa que las de Gaspar (1996) o Darriba, San Juan y Guerra (2004), pero considerando al conjunto de subfases III A-C de frecuente coexistencia, en ocasiones de difícil diferenciación y, en general, más propias de ser elegidas a nivel folicular que individual.

Asimismo, en *S. marginatus* se observa una proliferación de células madres en el intervalo comprendido entre la subfase III D y la fase I, unido a una todavía importante actividad gonadal resorptiva no señalada por Lubet (1959) en la fase 0. En este contexto, parece probable que la reabsorción de la gónada en *S. marginatus* sea más lenta que en mitílidos, debido a la ausencia de tejidos conectivos periféricos que incrementarían la irrigación y favorecerían la incorporación de hemocitos. Por otra parte, podría parecer incoherente denominar fase 0, o de reposo sexual, a un periodo en el que existe una proliferación de células madres. Las dos razones previas llevaron a redefinir en Remacha-Triviño (1996) y Remacha-Triviño (2002) la fase 0 de Lubet como fase IV de resorción o senescencia, en la que se da una prevalencia al proceso de reabsorción de la gónada que Lubet (1959) menciona en III D, pero no señala en 0.

Sin embargo, en el presente estudio se mantiene la fase 0 basándose en las siguientes consideraciones: (a) es discutible que las células madres sean consideradas propiamente células sexuales,

Figura 4. Distribución porcentual de fases del ciclo reproductivo determinadas mediante histología. (0): fase 0; (I): fase I; (II): fase II; (III): fase III.



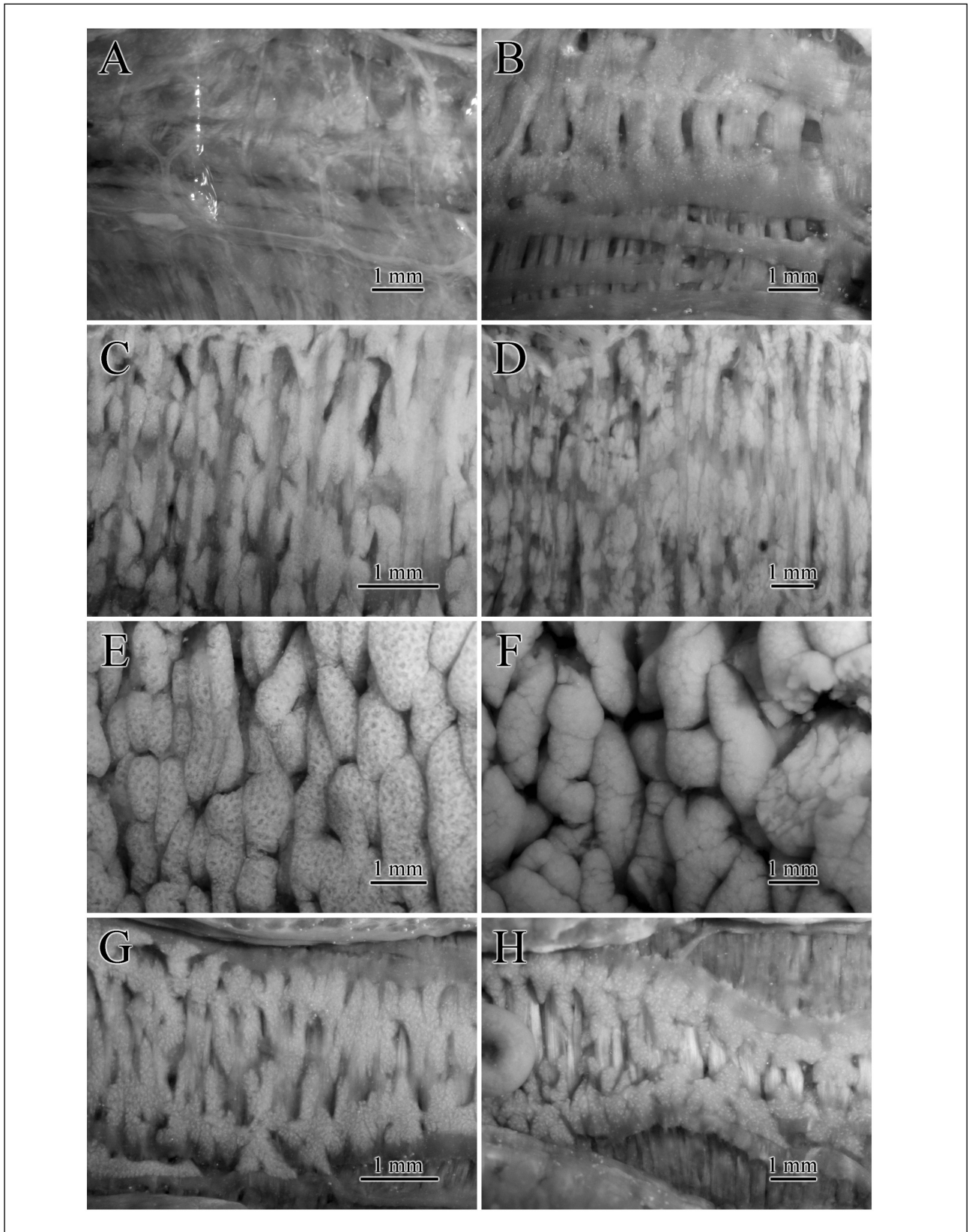


Figura 5. Gónadas de *S. marginatus* a escala macroscópica en diferentes fases de desarrollo. (A-B): fases 0 y I, indistintamente; sexo indeterminado. (C): femenina en fase II. (D): masculina en fase II. (E): femenina en fases IIIA-C. (F): masculina en fases III A-C. (G): femenina en fase III D. (G): masculina en fase III D.

y no únicamente precursoras de las mismas; (b) aun admitiendo que las células madres sean células sexuales, la actividad observada durante la fase 0 puede considerarse prácticamente nula en relación a los grados de proliferación y desarrollo alcanzados por la línea germinal durante el resto de fases del ciclo; y (c) la reabsorción de la gónada no es incompatible con la fase 0.

Observaciones macroscópicas

La escala de maduración utilizada en relación con la evolución de la gónada a nivel macroscópico es la detallada a continuación.

- Fases 0 y I. Gónada no observable o reducida a una fina capa de tejido translúcido. En ocasiones, se detectan manchas blanquecinas sobre la superficie de la cavidad pedia correspondientes a probables primordios de tejido folicular (figura 5A,B).
- Fase II. Gónada observable que reviste desde partes de la región medioventral del pie a casi toda su superficie interna. Cara interna de gónada distribuida en forma de repliegues transversales de apariencia vagamente tubular, pardos en hembras y blancoamarillentos en machos (figura 5C,D).
- Fase III. En las subfases III A, III B y III C, la gónada ocupa casi todo el seno pedio, induciendo la sobredilatación del pie, y se organiza en sáculos apelmazados, de superficie ondulada en hembras (figura 5E) y fragmentada en machos (figura 5F). En la subfase III D pueden observarse dos etapas: (a) etapa temprana, en la que la cara interna de la gónada está organizada en sáculos similares a subfases III A-C, pero de menor tamaño; y (b) etapa tardía, con repliegues tubulares salpicados de manchas debidas, probablemente, a la reabsorción. Por lo demás, gónada análoga a fase II (figura 5G,H).

La observación de la gónada a una escala macroscópica permite aproximar la fase del ciclo gametogénico de forma rápida y distinguir el sexo en las fases avanzadas de la gametogénesis.

Estimaciones de tamaño de los ovocitos

La medición de ovocitos de invertebrados y peces mediante ocular micrométrico es un procedimiento clásico (por ej.: Grant y Tyler, 1983). Sin embargo, en el caso de ovocitos elipsoidales pueden esperarse variaciones en la estimación del diámetro celular debidas a su orientación. En este trabajo se revisa este método y se da una razón física que implica que en ovocitos inmersos se tiende a medir la longitud celular. Las ventajas de este método (disgregación física de gónada más el uso de micrómetro) son dos: la ausencia de tratamientos químicos (líquido de Gilson, o la inclusión, que pueden destruir o modificar el volumen de los ovocitos), y su rapidez. Sin embargo, este procedimiento solo puede ser calificado de sesgado y aproximado. En relación con el seguimiento histológico realizado, la evolución del tamaño de los ovocitos obtenida por este procedimiento es concordante con el desarrollo del ciclo gametogénico (figura 6).

Pruebas de independencia

La tabla I muestra los resultados de las pruebas de independencia de las características longitud de las valvas y longitud media estimada de los ovocitos y los coeficientes de determinación de las regresiones entre la longitud valvar y la longitud media estimada de los ovocitos [\bar{L} (ovocitos) | L (valvas)]. La independencia de dichas variables es confirmada en todas las muestras contrastadas ($p > 0,05$).

Las pruebas de independencia confirman que las muestras capturadas con arpón de mariscador son adecuadas para analizar la evolución de la gametogénesis de forma insesgada. Las correlaciones observadas entre la longitud valvar y la longitud media estimada de los ovocitos de las muestras fisgadas resultan en todos los casos tan bajas que se puede descartar con seguridad la existencia de una relación de dependencia entre ambas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección Regional de Pesca del Principado de Asturias por autorizar los muestreos, al

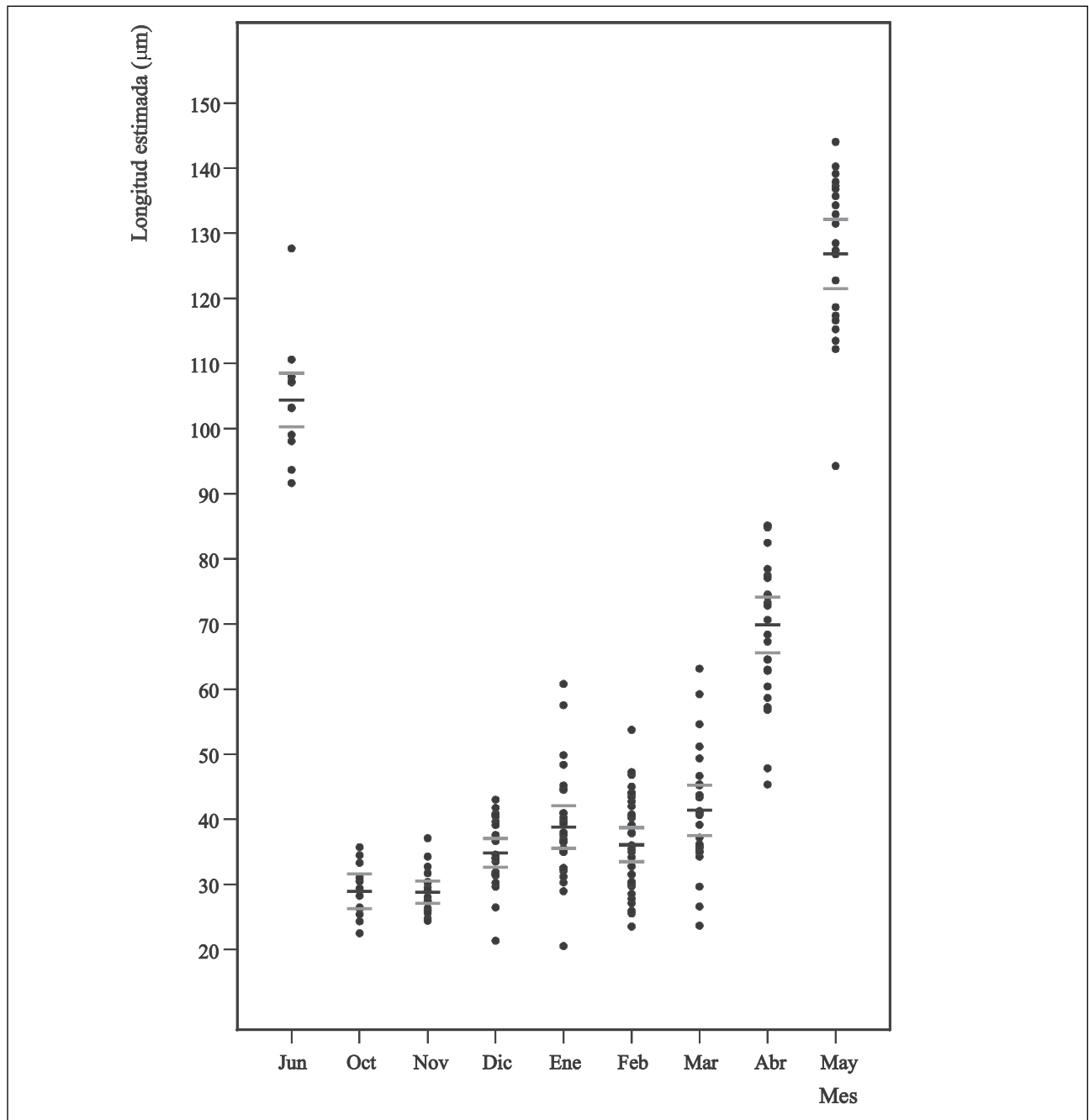


Figura 6. Diagramas de dispersión, medias (líneas negras) e intervalos de confianza (líneas grises) correspondientes a la longitud estimada de los ovocitos.

mariscador D. Manuel Fernández González, sin cuya colaboración e implicación este estudio habría resultado imposible y a Montserrat Cayado López, por su ayuda en los muestreos. La investigación fue realizada dentro del Proyecto de Temática Asturiana FC-TA-96-517-2, subvencionado por la Universidad de Oviedo en 1996.

BIBLIOGRAFÍA

- Casavola, N., N. Rizzi, N. Marano y C. Saracino. 1985. Ciclo riproduttivo e biometria di *Ensis minor* (Chenu) (Bivalvia: Solenidae) nel golfo di Manfredonia. *Oebalia* 11: 439-449.
- Chipperfield, P. N. J. 1953. Observations on the breeding and on the settlement of *Mytilus edulis* in the British waters. *J. Mar. Biol. Ass. (UK)* 32: 449-476.

- Cosel, R. 1993. The razor shells of the eastern Atlantic. Part I: Solenidae and Pharidae. (Bivalvia: Solenacea). *Archiv für Molluskenkunde* 122: 207-321.
- Darriba, S., F. San Juan y A. Guerra. 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311: 101-115.
- Durfort, M. 1993. Técnicas histopatológicas en moluscos. En: *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*. F. Castelló Orvay (ed.): 587-598. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Galinou-Mitsoudi, S. y A. I. Sinis. 1994. Reproductive cycle and fecundity of the date mussel *Lithophaga lithophaga* (Bivalvia: Mytilidae). *J. Molluscan Stud.* 60: 371-385.
- Gaspar, M. B. 1996. *Bivalves do litoral oceânico algarvio. Aspectos da biologia, ecologia e da pescaria dos mananciais de interesse económico: aplicação á gestao dos recursos*. Tesis doctoral. Universidad de Faro. Faro, Portugal: 282 pp.
- Grant, A. y P. A. Tyler. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *Int. J. Invertebr. Reprod.* 6: 259-269.
- Hooker, S. y R. G. Greese. 1995. The reproductive biology of Pipi, *Paphies australis* (Gwenlin, 1790) (Bivalvia: Mesodesmatidae). I. Temporal patterns of the reproductive cycle. *J. Shellfish Research* 14 (1): 7-15.
- López, J., C. Rodríguez y J. F. Carrasco. 2005. Comparativa del ciclo reproductivo de *Solen marginatus* (Pulterney, 1799) (Mollusca: Bivalvia) en las rías del Eo y Villaviciosa (Asturias): Relación con los parámetros ambientales. En: *Libro de Resúmenes del X Congreso nacional de acuicultura: La Acuicultura, fuente de pescado de calidad para el futuro, Gandía (Valencia), 2005*. Tomo II: 518-519 [póster]. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Lubet, P. 1959. *Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés*. Tesis doctoral de Estado. Facultad de Ciencias. Universidad de París. París: 162 pp.
- Martín, A. M. y J. de D. Luna. 1984. *Bioestadística para las ciencias de la salud*. Norma. Madrid: 622 pp.
- Martínez, D. 2002. *Estudio de los Solénidos, Solen marginatus (Pennant, 1777) y Ensis siliqua (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela (A Coruña), España: 240 pp.
- Martínez, D., E. Rodríguez-Moscoso, R. Arnaiz, S. Novoa y J. Ojea. 1997. Gametogénesis y composición bioquímica en una población de *Ensis siliqua* (Linné, 1758) en la Ría del Barquero (N. Galicia). En: *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura* (9-11 de julio, 1997. Cartagena, Murcia, España). J. de Costa, E. Abellán, B. García, A. Ortega y S. Zamora (eds.): 155-160. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Remacha-Triviño, A. 1996. *Ciclo reproductivo y biometría de Solen marginatus (Pennant, 1777) (Mollusca: Bivalvia) en la Ría del Eo*. Seminario de investigación. Universidad de Oviedo. Oviedo (Asturias), España: 26 pp.
- Remacha-Triviño, A. 2002. *Estereología Moderna y Anatomía del aparato excretor, espacios de referencia y tejido hemolinfático de Solen marginatus (Mollusca: Bivalvia). Interacciones fisiopatológicas del nefrídio en relación al desarrollo del ciclo reproductivo*. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo (Asturias), España: 308 pp.
- Rodríguez, C. y J. F. Carrasco. 1995. Estudio de un banco natural de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) en la Ría del Eo (Asturias). En *Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura* (10-13 de mayo 1995, Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, España): 270-275. F. Castelló i Orvay y A. Calderer i Rey (eds.): 318-323. Publicacions de la Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- Rodríguez-Moscoso, E., J. P. Pazo, A. García y F. Fernández-Cortés. 1992. Reproductive cycle of Manila Clam *Ruditapes philippinarum* (Adams y Reeve, 1850) in Ría of Vigo (NW Spain). *Scientia Marina* 56 (1): 61-67.
- Rodríguez-Moscoso, E., E. D. Martínez, R. Arnaiz, G. Mosquera, A. Cerviño, A. de Coó, A. García y N. Rúa. 1996. Gametogénesis, reservas energéticas y desarrollo larvario en el longueirón, *Solen marginatus* (Pennant, 1777). En: *IX Simposio Ibérico de Estudios del Bentos Marino, Alcalá de Henares 19-23 febrero 1996: Libro de Resúmenes*: 164-165. Departamento de Biología Animal, Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares (Madrid), España.
- Shafee, M. S. y M. Daoudi. 1991. Gametogenesis and spawning in the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia) from the Atlantic Coast of Morocco. *Aquacult. Fish. Manage.* 22: 203-216.
- Tirado, C., A. Rodríguez, M. A. Bruzón, J. I. López, C. Salas e I. Márquez. 2002. *La reproducción de bivalvos y gasterópodos de interés pesquero en Andalucía*. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, España: 129 pp.
- Tranter, D. 1958. Reproduction in Australian Pearl oysters (Lamelibranchia) (*Pinctada albina* Lmk.). *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* 9 (1): 135-158.
- Villalba, A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (NW Spain). *Aquaculture* 130: 269-277.